

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

27.5.2004

REC'D 17 JUN 2004

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日      2003年  3月17日  
Date of Application:

出願番号      特願2003-071788  
Application Number:  
[ST. 10/C] : [JP2003-071788]

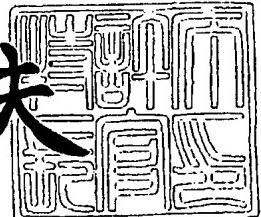
出願人  
Applicant(s): 有限会社ピークル  
ブイアイビー (ヴァーラム インターユニベルシテール  
インスティチュート フォア ビオテクノロジー) ブイジ  
ーダブリュ  
デー. コーレン リサーチ ファondonシオン ブイジーダ  
ブリュ オンデルビース アン ナボルシング カンパス  
ガスチュイスベルグ ケ. ュー. リューベン

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月20日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 03P08BK01  
【提出日】 平成15年 3月17日  
【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿  
【国際特許分類】 A61K 48/00  
A61K 9/51  
A61K 47/42  
A61P 7/04

## 【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区納戸町 6  
【氏名】 上田 政和

## 【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市上山田 7番C-104号  
【氏名】 黒田 俊一

## 【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊能郡豊能町希望ヶ丘 2-30-2  
【氏名】 谷澤 克行

## 【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市門田文化町 2-10-13  
【氏名】 妹尾 昌治

## 【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市灘区篠原伯母野山町 1-1-2-806  
【氏名】 近藤 昭彦

## 【発明者】

【住所又は居所】 ベルギー王国、B-3360 コルベックロー ステー  
レンラーン 17  
【氏名】 シエリー バンデンドリエッシェ

**【発明者】**

【住所又は居所】 ベルギー王国、B-3360 コルベックロー ステー  
レンラーン 17

【氏名】 マリニー チュア

**【特許出願人】**

【住所又は居所】 岡山県岡山市門田文化町2-10-13

【氏名又は名称】 有限会社ビークル

**【特許出願人】**

【住所又は居所】 ベルギー王国、B-9052 ズビナーデ リビッシュエ  
ストラート 120

【氏名又は名称】 ブイアイビー (ヴァーラム インターユニベルシテー  
ル インスティチュート フォア ビオテクノロジー)  
ブイジーダブリュ

**【特許出願人】**

【住所又は居所】 ベルギー王国、B-3000 リューベン ヘーレスト  
ラート 49

【氏名又は名称】 デー. コーレン リサーチ ファオンドシオン ブイジ  
ーダブリュ オンデルビース アン ナボルシング カ  
ンパス ガスチュイスベルグ ケ. ュー. リューベ  
ン

**【代理人】**

【識別番号】 100067736

**【弁理士】**

【氏名又は名称】 小池 晃

**【選任した代理人】**

【識別番号】 100086335

**【弁理士】**

【氏名又は名称】 田村 築一

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100096677

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 伊賀 誠司

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 019530

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 血友病治療用薬剤及びそれを用いた血友病治療方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 粒子形成能を有するタンパク質からなる中空ナノ粒子に、血友病治療用の遺伝子が含まれてなることを特徴とする血友病治療用薬剤。

【請求項 2】 真核細胞でタンパク質を発現させて得られるタンパク質粒子に生体認識分子が導入された中空ナノ粒子に、血友病治療用の遺伝子が含まれてなることを特徴とする血友病治療用薬剤。

【請求項 3】 上記真核細胞は、酵母又は遺伝子組換え酵母であることを特徴とする請求項 2 記載の血友病治療用薬剤。

【請求項 4】 上記真核細胞は、昆虫細胞であることを特徴とする請求項 2 記載の血友病治療用薬剤。

【請求項 5】 上記真核細胞は、動物細胞であることを特徴とする請求項 2 記載の血友病治療用薬剤。

【請求項 6】 粒子を形成する上記タンパク質は、B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 5 のいずれか 1 項記載の血友病治療用薬剤。

【請求項 7】 上記血友病治療用の遺伝子は、血液凝固第VIII因子又は血液凝固第IX因子であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか 1 項記載の血友病治療用薬剤。

【請求項 8】 静脈注射により人体に投与されることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 7 のいずれか 1 項記載の血友病治療用薬剤。

【請求項 9】 請求項 1 乃至請求項 8 のいずれか 1 項記載の薬剤を投与することを特徴とする血友病治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、中空ナノ粒子を用いる血友病治療用薬剤及びそれを用いた血友病治療方法に関し、より詳細には、粒子内部に血友病治療用の細胞導入物質を包含し

、この細胞導入物質を細胞内に特異的に導入可能な薬剤及びそれを用いた血友病治療方法に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

近年、医学の分野において、患部に直接作用し、高い効果を示す副作用の少ない薬品の開発が盛んに行われている。特に、ドラッグデリバリーシステム（DDS）と呼ばれる方法は、目的細胞や目的組織に対して特異的に薬剤等の有効成分を運搬し、目的箇所で有効成分を作用させることのできる方法として注目されている。

#### 【0003】

また、最近の分子細胞生物学の分野においても、特定細胞への遺伝子導入は必要不可欠な技術として盛んに研究されている。さらに、ヒトゲノム計画の進展により各種疾患の遺伝的な背景が明らかになりつつある現在、このような細胞、組織に対する特異性の高い遺伝子導入法が確立されれば、遺伝子治療の分野での応用も可能となる。

#### 【0004】

細胞に遺伝子を導入する方法としては、これまでに、遺伝子を巨大分子化してエンドサイトシスによって遺伝子を取り込ませる方法（リン酸カルシウム法、リポフェクタミン法）や、電気パルス刺激により細胞膜に穿孔を開け、遺伝子を導入させる方法（エレクトロポレーション法、遺伝子銃法）が知られており、何れも今日では、分子生物学的実験において一般的に実施されている方法である。

#### 【0005】

これらの方法は簡便であるが、細胞を直接、物理的に傷つけ、遺伝子導入部位を外科的に露出させる必要があるため、生体内部の細胞や組織には容易に適用できない。また、100%近い導入率を得ることは難しい。

#### 【0006】

一方、安全性の高い物質導入方法としてはリポソーム法が知られている。この方法は、細胞を傷つけることがないため、生体内部の細胞や組織にも適用することが可能である。しかしながら、単純な脂質であるリポソームに高度な細胞及び

組織特異性を付与することは困難であり、さらに、in vivo での遺伝子導入率は、要求される値に比べてはるかに低いという問題がある。

#### 【0007】

最近になって、ウイルスDNAに目的の遺伝子を組み込み、感染性ウイルスを生成して遺伝子導入を行う技術が開発された。この方法は導入部位を露出する必要がなく、個体にも応用でき、導入効率も100%近いため、各種遺伝性疾患や後天性疾患に対する遺伝子治療のための画期的な方法として注目されている。

#### 【0008】

例えば、血友病は血液凝固因子の欠乏により出血を主徴とする遺伝性疾患である。このうち血液凝固第VIII因子（抗血友病因子）の欠乏症が血友病A、血液凝固第IX因子（クリスマス因子）の欠乏症が血友病Bであり、両者ともX染色体上にある第VIII（IX）因子の遺伝子異常が原因とされる。一般に、このような血友病患者に対しては、第VIII（IX）因子製剤の静脈内投与による補充療法が行われるが、生理的レベルに近い量の凝固因子を恒常に発現させるために、例えば下記の特許文献1では、第VIII因子をコードする配列を含むアデノ随伴ベクターを作製し、これを血友病Aの患者に投与する技術が提案されている。

#### 【0009】

しかしながら、このようなウイルスDNAを用いた遺伝子導入では、ウイルスが広範囲の細胞に非特異的に感染するため目的の細胞以外にも遺伝子が導入されてしまうという重大な問題がある。また、ウイルスゲノム本体が染色体に組み込まれ、将来予期できぬ副作用を引き起こす可能性がある。さらに、細胞及び組織特異性がないため、この第VIII因子を肝臓で発現させるためには、例えば門脈投与するか、又は第VIII因子をコードする配列と組織型により特異的に転写される制御配列とを連結する必要がある。

#### 【0010】

一方、本件発明者らは、下記の特許文献2において、粒子形成能を有する蛋白質に生体認識分子が導入された中空ナノ粒子を用いて、目的とする細胞や組織に、物質（遺伝子、タンパク質、化合物等）を特異的且つ安全に運搬、導入するための方法を提案している。

**【0011】****【特許文献1】**

特表2002-527493号公報

**【特許文献2】**

特開2001-316298号公報

**【0012】****【発明が解決しようとする課題】**

上記特許文献2に記載の技術によれば、中空ナノ粒子により種々の物質を運搬することができるが、この方法を用いる特定疾患、例えば血友病に対する治療薬の開発がさらなる課題となっていた。

**【0013】**

本発明は、このような従来の実情に鑑みて提案されたものであり、簡便な方法により血液凝固因子の遺伝子を肝細胞に効率的に導入することができると共に、副作用の心配も極めて低い血友病治療用薬剤、及びそれを用いた血友病治疗方法を提供することを目的とする。

**【0014】****【課題を解決するための手段】**

本件発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、ヒト肝臓癌細胞を移植した実験動物に、血液凝固第VIII、第IX因子の遺伝子を包含したB型肝炎ウィルス表面抗原粒子を静脈注射することにより、ヒト肝臓由来組織部分に特異的に遺伝子が導入されて血液凝固因子を発現し、血友病を治療する効果があることを見出し、本発明を完成させるに至った。

**【0015】**

すなわち、本発明に係る血友病治療用薬剤は、粒子形成能を有するタンパク質からなる中空ナノ粒子に、血友病治療用の遺伝子が包含されてなるものである。

**【0016】**

また、本発明に係る血友病治療用薬剤は、真核細胞でタンパク質を発現させて得られるタンパク質粒子に生体認識分子が導入された中空ナノ粒子に、血友病治療用の遺伝子が包含されてなるものである。

**【0017】**

粒子を形成する上記タンパク質としては、例えばB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質を挙げることができる。このタンパク質は、真核細胞で発現させると、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出される。こうして得られた中空ナノ粒子は、肝細胞を認識し、肝細胞に対して特異的に粒子内の物質を運搬することができるので、血友病治療用の遺伝子、具体的には血液凝固第VIII因子又は血液凝固第IX因子を包含させることにより、肝細胞において特異的にその遺伝子を発現させることができる。

**【0018】**

本発明に係る血友病治療用薬剤は、静脈注射という簡便な方法で血友病を効果的に治療することができ、副作用の心配も極めて低く、そのまま臨床応用可能なものである。

**【0019】**

また、本発明に係る血友病治疗方法は、本発明に係る血友病治療用薬剤を投与することにより血友病を治療するものである。

**【0020】****【発明の実施の形態】**

本実施の形態における中空ナノ粒子は、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子を導入することによって、任意の細胞或いは組織、例えば肝細胞、肝組織に特異的に血液凝固第VIII、第IX因子をコードする遺伝子を運搬することを可能とするものである。このような粒子形成能を有するタンパク質としては、種々のウイルスから得られるサブウイルス粒子を適用することができる。具体的には、B型肝炎ウィルス (Hepatitis B Virus; HBV) 表面抗原タンパク質等が例示される。

**【0021】**

また、このような粒子形成能を有するタンパク質からなるタンパク質粒子としては、真核細胞でタンパク質を発現させることにより得られるものが挙げられる。つまり、真核細胞で粒子形成能を有するタンパク質を発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出され

る。このとき、真核細胞としては、酵母や遺伝子組換え酵母、昆虫細胞、動物細胞等が適用できる。

#### 【0022】

本件発明者らは、後述の実施例に示す通り、遺伝子組換え酵母で前記H B V表面抗原Lタンパク質を発現させることにより、発現されたH B V表面抗原Lタンパク質から酵母由来の脂質二重膜に多数の同タンパク質が埋め込まれた短径約20 nm、長径約150 nmの橢円状中空粒子が形成されることを見出し、報告している (J. Bio. Chem., Vol. 267, No. 3, 1953-1961, 1992)。このような粒子は、H B VゲノムやH B Vタンパク質を全く含まないので、ウィルスとしては機能せず、人体への安全性が極めて高い。また、H B Vの肝細胞への極めて高い感染力を担う肝細胞特異的レセプターを粒子表面に提示しているため、肝細胞に対して特異的に物質を運搬する運搬体としての効果も高い。

#### 【0023】

このように遺伝子組換え酵母を用いてタンパク質粒子を形成する方法は、菌体内の可溶性タンパク質から高効率で粒子が生産される点で好適である。

#### 【0024】

一方、昆虫細胞や動物細胞は、酵母よりも高等動物に近い真核細胞であるといえ、酵母では再現しきれない糖鎖等の高次構造をも再現できる点で異種タンパク質の大量生産において好ましい方法といえる。従来の昆虫細胞の系はバキュロウイルスを用いた系で、ウィルス発現を伴うものであったために、タンパク質発現に際して細胞が死滅したり溶解したりした。その結果、タンパク質発現を連続的に行ったり、死滅細胞から遊離したプロテアーゼによりタンパク質が分解したりするという問題があった。また、タンパク質を分泌発現させる場合には、培地中に含まれる牛胎仔血清が大量に混入することで、その精製が困難であった。しかし、最近になって、バキュロウイルスを介さない昆虫細胞系で、無血清培養可能なものがインビトロゲン (Invitrogen) 社により開発され、市販されている。したがって、このような昆虫細胞を用いれば、精製が容易で高次構造をも再現されたタンパク質粒子が得られる。

#### 【0025】

本発明の中空ナノ粒子では、以上のような種々の方法によって得られた粒子表面のレセプターを任意の生体認識分子に改変することにより、肝細胞以外にも、任意の細胞及び組織に極めて高い特異性で物質を運搬、導入することが可能となる。

#### 【0026】

勿論、粒子形性能を有するタンパク質は、前記のB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質に限られるものではなく、粒子を形成することができるタンパク質であれば、どのようなものでもよく、動物細胞、植物細胞、ウィルス、菌類等に由来する天然タンパク質や、種々の合成タンパク質等が考慮される。また、例えばウイルス由来の抗原タンパク質等が生体内において抗体を惹起する可能性がある場合などは、改変して抗原性を減少させたものを生体認識分子として用いてもよい。

#### 【0027】

粒子形成能を有するタンパク質に導入される生体認識分子としては、例えば成長因子、サイトカイン等の細胞機能調節分子、細胞表面抗原、組織特異的抗原、レセプターなどの細胞及び組織を識別するための分子、ウィルス及び微生物に由来する分子、抗体、糖鎖、脂質などが好ましく用いられる。これらは、目的とする細胞或いは組織に応じて適宜選択される。

#### 【0028】

本発明では、以上のような中空ナノ粒子に、任意の細胞又は組織、例えば肝細胞又は肝組織に導入したい血液凝固第VIII、第IX因子をコードする遺伝子を内包させることによって、血友病治療治療用の物質運搬体を得る。

#### 【0029】

この遺伝子を上記の中空ナノ粒子に導入する方法としては、通常の化学的、分子生物学的実験手法で用いられる様々な方法が適用される。例えば、エレクトロポレーション法、超音波法、単純拡散法、或いは電荷を有する脂質を用いる方法等が好ましく例示される。

#### 【0030】

そして、これらの中空ナノ粒子、或いは物質運搬体を用いて、in vivo 或いは

in vitro で細胞又は組織に特異的に物質を導入することが可能となる。さらには、中空ナノ粒子や物質運搬体を用いて、特定細胞又は組織に物質を導入することを各種疾患の治療法或いは治療法の 1 ステップとして行うことも可能になる。

### 【0031】

本発明の薬剤の効果については、後述の実施例に示す通り、動物実験により実際に確認された。この実施例では、ヒト肝臓癌由来の細胞を移植したヌードマウスに、血液凝固第VIII（IX）因子をコードする遺伝子を包含した本発明の薬剤を投与後、血清中の第VIII（IX）因子の発現レベルを測定することによって確認した。薬剤の投与は静脈内投与により行ったが、投与方法としては、この他に経口投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮下投与等が挙げられる。

### 【0032】

以下、本発明を適用した具体的な実施例について、図面を参照しながら詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において種々の変更が可能であることは勿論である。

### 【0033】

#### 【実施例】

以下の実施例において、HBsAg とは、B型肝炎ウィルス表面抗原 (Hepatitis B virus surface Antigen) を示す。HBsAg は、HBV の外被タンパク質であり、図1の模式図に示すように、HBsAg には、Sタンパク質、Mタンパク質、Lタンパク質の3種類がある。このうち、Sタンパク質は、3種のタンパク質に共通した、重要な外被タンパク質であり、Mタンパク質は、Sタンパク質のN末端側に55アミノ酸からなる pre-S2ペプチドが付加したものである。また、Lタンパク質は、Mタンパク質のN末端側に、108又は119アミノ酸からなる pre-S1ペプチドが付加したものである。このLタンパク質の塩基配列を配列番号1に、アミノ酸配列を配列番号2に示す。

### 【0034】

HBsAg Lタンパク質の pre-S1領域は、肝細胞に直接結合する部位を持ち、HBVが肝細胞に結合する際に、それぞれ重要な役割を担うことが知られている (Cell, Vol.46, 429-436, 1986 ; J. of Virol., Vol.73, 2052-2057,

1999)。

### 【0035】

真核細胞でHBsAgを発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積される。HBsAgのLタンパク質は、分子間で凝集を起こし、小胞体膜を取り込みながら、出芽様式でルーメン側に粒子として放出される。

### 【0036】

以下の実施例では、HBsAgのLタンパク質を用いた。また、図2に以下の実施例に記載されるHBsAg粒子の発現及び精製操作の概略説明図を示した。

### 【0037】

#### 実施例1

##### 遺伝子組換え酵母によるHBsAg粒子の発現

本件発明者らによって報告された文献「J.Bio.Chem., Vol.267, No.3, 1953-1961, 1992」記載の方法に基づいて、Lタンパク質発現プラスミドpGLDLIIP39-RcTを保持した遺伝子組換え酵母（Saccharomyces Cerevisiae AH22R- 株）を、合成培地High-Pi 及び8S5N-P400 中で培養し、Lタンパク質粒子を発現させた（図2 a、 b）。定常成長期（約72時間後）にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical Co. 製) を用いて、whole cell extract を準備し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離して、銀染色によって試料中のHBsAgの同定を行った。これにより、HBsAgは分子量約52kDaのタンパク質であることが明らかとなった。

### 【0038】

#### 実施例2

##### HBsAg粒子の遺伝子組換え酵母からの精製

(1) 合成培地8S5N-P400で培養された遺伝子組換え酵母（湿重量26g）をbuffer A溶液（7.5M 尿素、0.1M リン酸ナトリウム（pH 7.2）、15mM EDTA、2mM PMSF、0.1% Tween80）100mlに懸濁し、グラスビーズを用いてビードビーター (BEAD-BEATER) にて酵母を破

碎した。破碎後、上清を遠心分離により回収した（図2c、d）。

#### 【0039】

(2) 次に、上清を0.75倍容の33%（w/w）PEG6000と混合し、30分間氷冷した。その後、遠心分離（7000 rpm、30分間）を行い、ペレットを回収した。同ペレットは、Tween80を含まないbuffer A溶液中で再懸濁した。

#### 【0040】

(3) 再懸濁した液を、10～40%の勾配をかけたCsClに重層し、28000 rpm、16時間の超遠心分離を行った。遠心分離後の試料を12画分に分け、ウェスタンプロット法（Western Blotting）（1次抗体は、抗HBsAgモノクローナル抗体）によりHBsAgを含む画分を同定した。さらに、HBsAgを含む画分をTween80を含まないbuffer A溶液で透析した。

#### 【0041】

(4) (3)で得られた透析液（12ml）を5～50%の勾配をかけたショ糖に重層し、28000 rpm、16時間の超遠心分離を行った。遠心分離後、

(3)と同様に、HBsAgを含む画分を同定し、HBsAgを含む画分を尿素とTween80は含まず、代わりに0.85%のNaClを含むbuffer A溶液で透析した（(2)～(4)：図2e）。

#### 【0042】

(5) (4)と同様の操作を繰り返し、透析後の試料をウルトラフィルター（Ultra Filter）Q2000（アドバンテック社製）を用いて濃縮し、使用する時まで4℃にて冷蔵保存した（図2f）。CsCl平衡遠心分離後のウェスタンプロット（3）の結果から、HBsAgは、分子量52kDaでS抗原性を有するタンパク質であることが分かった。最終的に、培地2.5L由来、湿重量26gの菌体から、約24mgの精製HBsAg粒子を得た。

#### 【0043】

一連の精製過程における画分を銀染色SDS-PAGEで解析した。また、精製により酵母由来のプロテアーゼが除去されていることを確認するために、(5)で得られたHBsAg粒子を37℃で12時間インキュベートした後、SDS

- PAGEを行い、銀染色により同定を行った。その結果、酵母由来のプロテアーゼは、一連の精製過程において完全に除去されていることが確認された。

#### 【0044】

##### 実施例3

HBsAg粒子へのhFVIII、hFIX遺伝子の封入（hFVIII、hFIX遺伝子を包含したHBsAg粒子の製造）

上記方法により作製したHBsAg粒子内へ、血友病治療用遺伝子としてヒト血液凝固第VIII(IX)因子をコードする遺伝子(hFVIII、hFIX)を封入し、本発明の薬剤としてのhFVIII(hFIX)遺伝子を包含したHBsAg粒子を製造した。

#### 【0045】

本実施例では、HBsAg粒子内へhFVIII遺伝子及びhFIX遺伝子を封入するため、それぞれトリノ大学のL.Naldini博士から恵与されたpRRLsin.cPPT.CMV.FVIII.Wpre及びpRRLsin.cPPT.Alb.FIX.Wpre(Human Gene Therapy, Vol.13, 243-260, 2002)を発現ベクターとして使用した。

#### 【0046】

この発現ベクターをエレクトロポレーション法によりHBsAg粒子内に導入することによって、hFVIII(hFIX)遺伝子が包含されたHBsAg粒子を作製した。具体的には、 $500\mu l$ のPBS(pH7.2)に溶解されたHBsAg粒子中のLタンパク質粒子 $100\mu g$ に対し、上記発現ベクターを $20\mu g$ 導入した。またこのとき、エレクトロポレーションは、Gene Pulser II electroporation system(Bio-Rad社製)により、50V、 $750\mu F$ で4mmのキュベットを使用して行った。

#### 【0047】

##### 実施例4

ヒト肝臓癌を移植したヌードマウスに対するhFVIII(hFIX)遺伝子包含HBsAg粒子による血液凝固第VIII(IX)因子の発現効果

上記実施例により作製したhFVIII(hFIX)遺伝子を包含するHBsAg粒子による血液凝固第VIII(IX)因子の発現効果を実験動物により確認した。

**【0048】**

本実施例では、実験動物として日本クレアから購入したヌードマウス (Balb/c nu/nu、メス 5 週齢) の両側背部皮下に、ヒト肝臓癌由来細胞N u E を  $1 \times 10^7$  個投与し、直径 1 cm 程度の固形癌になるまで約 5, 6 週間生育させ、担癌マウスを得た。

**【0049】**

その後、上記担癌マウスに、約  $20 \mu g$  の h F VIII (h FIX) 遺伝子発現ベクターを包含する H B s A g 粒子を尾静脈より投与し、血漿中の血液凝固第VII I (IX) 因子の量をエンザイムイムノアッセイ (ELISA) により継時的に測定した。ELISAは、それぞれ第VIII、第IX因子に特異的なAsserachom VIIIIC :Ag kit、Asserachom IX:Ag kit (Diagnostica Stago社製) を使用して行った。

**【0050】**

なお、陰性対照としてはヒト大腸癌由来細胞W i D r を  $1 \times 10^7$  個投与して得た担癌マウスを用い、上記と同様にして血漿中の血液凝固第VIII (IX) 因子の量を測定した。

**【0051】**

測定した血漿中の血液凝固第VIII因子量の、上記キットの陽性対照血漿中の血液凝固第VIII因子量に対する割合 (%) の推移を図3に示す。また、血漿中の血液凝固第IX因子の濃度推移を図4に示す。図3、4に示すように、陰性対照では継時的な変化は見られなかったのに対して、ヒト肝臓由来の腫瘍細胞 (N u e) を投与したマウスでは 10 日前後経過してから血液凝固第VIII、第IX因子の発現が見られ、「重度」のヒト患者を「中度」に改善する程度の発現レベル (Cur. Gene Therapy, Vol.1, 301-305, 2001) に達した。その後、このレベルが少なくとも 1 ヶ月維持され、40 日程度経過後に低下した。この発現の低下は、腫瘍細胞 (N u e) に由来する癌のネクローシスによるものと考えられる。

**【0052】**

このように、本実施の形態における薬剤としての h F VIII (h FIX) 遺伝子包含H B s A g 粒子は、ヒト肝細胞に対して極めて高い特異性と効率で遺伝子導

入が可能であり、血友病に対して実際に治療効果があることが確認された。また、本実験により、上記 h F VIII (h FIX) 遺伝子包含 H B s A g 粒子による血友病治療のためのプロトコールを実験動物で確立することができた。

#### 【0053】

なお、上述した実施例では、h F VIII (h FIX) 遺伝子を発現するベクターとして pRRLsinPPTCMVFVIIIPre (pRRLsinPPTAlbFIXpre) を使用したが、これに限定されるものではなく、例えば文献「Cur. Gene Therapy, Vol. 1, 301-305, 2001」に記載されているような種々のベクターを利用することができる。また、例えば血液凝固第VIII因子の軽鎖と重鎖とを別々のベクターに組み込むようにしてもよく、B ドメインを欠失させた血液凝固第VIII因子をベクターに組み込むようにしても、同様の効果を奏することができる。

#### 【0054】

##### 【発明の効果】

以上詳細に説明したように、本発明に係る血友病治療用薬剤は、静脈注射という簡便な方法で血友病を効果的に治療することができ、副作用の心配も極めて低く、そのまま臨床応用可能なものである。

#### 【0055】

##### 【配列表】

##### SEQUENCE LISTING

<110> Beacle Inc.

VIB (Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie) vzw

D. Collen Research Foundation vzw Onderwijs en Navorsing Campus Gas

thuiserg K.U. Leuven

<120> 血友病治療用薬剤及びそれを用いた血友病治療方法

<130> 03P08BK01

&lt;160&gt; 2

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1218

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hepatitis B virus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1218)

&lt;400&gt; 1

atg aga tct ttg ttg atc ttg gtt ttg tgt ttc ttg cca ttg gct gct      48  
 Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala  
 1                5                10                15

ttg ggt aag gtt cga caa ggc atg ggg acg aat ctt tct gtt ccc aat      96  
 Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn  
 20                25                30

cct ctg gga ttc ttt ccc gat cac cag ttg gac cct gcg ttc gga gcc      144  
 Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala  
 35                40                45

aac tca aac aat cca gat tgg gac ttc aac ccc aac aag gat caa tgg      192  
 Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Gln Trp  
 50                55                60

cca gag gca aat cag gta gga gcg gga gca ttc ggg cca ggg ttc acc      240

Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly Pro Gly Phe Thr  
 65                    70                    75                    80

cca cca cac ggc ggt ctt ttg ggg tgg agc cct cag gct cag ggc ata        288  
 Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile  
 85                    90                    95

ttg aca aca gtg cca gca gca cct cct cct gcc tcc acc aat cgg cag        336  
 Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln  
 100                  105                  110

tca gga aga cag cct act ccc atc tct cca cct cta aga gac agt cat        384  
 Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Ser His  
 115                  120                  125

cct cag gcc atg cag tgg aat tcc aca aca ttc cac caa gct ctg cta        432  
 Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu  
 130                  135                  140

gat ccc aga gtg agg ggc cta tat ttt cct gct ggt ggc tcc agt tcc        480  
 Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser  
 145                  150                  155                  160

gga aca gta aac cct gtt ccg act act gcc tca ccc ata tct ggg gac        528  
 Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Gly Asp  
 165                  170                  175

cct gca ccg aac atg gag aac aca aca tca gga ttc cta gga ccc ctg        576  
 Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu

180 185 190  
ctc gtg tta cag gcg ggg ttt ttc ttg ttg aca aga atc ctc aca ata 624  
Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile

cca cag agt cta gac tcg tgg tgg act tct ctc aat ttt cta ggg gga      672  
 Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly  
                   210                215                220

gca ccc acg tgt cct ggc caa aat tcg cag tcc cca acc tcc aat cac 720  
 Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His  
 225 230 235 240

tca cca acc tct tgt cct cca att tgt cct ggc tat cgc tgg atg tgt 768  
 Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys  
 245 250 255

ctg cgg cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc ctg ctg cta tgc ctc atc 816  
 Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile  
 260 265 270

ttc ttg ttg gtt ctt ctg gac tac caa ggt atg ttg ccc gtt tgt cct 864  
Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro  
275 280 285

cta ctt cca gga aca tca acc acc agc acg ggg cca tgc aag acc tgc 912  
 Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys  
 290                    295                    300

acg att cct gct caa gga acc tct atg ttt ccc tct tgt tgc tgt aca			960
Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr			
305	310	315	320
aaa cct tcg gac gga aac tgc act tgt att ccc atc cca tca tcc tgg			1008
Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp			
325	330	335	
gct ttc gca aga ttc cta tgg gag tgg gcc tca gtc cgt ttc tcc tgg			1056
Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp			
340	345	350	
ctc agt tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg ttc gta ggg ctt tcc ccc			1104
Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro			
355	360	365	
act gtt tgg ctt tca gtt ata tgg atg atg tgg tat tgg ggg cca agt			1152
Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser			
370	375	380	
ctg tac aac atc ttg agt ccc ttt tta cct cta tta cca att ttc ttt			1200
Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe			
385	390	395	400
tgt ctt tgg gta tat att			1218
Cys Leu Trp Val Tyr Ile			
	405		

<210> 2

<211> 406

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 2

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala

1

5

10

15

Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn

20

25

30

Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala

35

40

45

Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Gln Trp

50

55

60

Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly Pro Gly Phe Thr

65

70

75

80

Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile

85

90

95

Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln

100

105

110

Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Ser His

115

120

125

Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu  
130 135 140

Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser  
145 150 155 160

Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Gly Asp  
165 170 175

Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu  
180 185 190

Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile  
195 200 205

Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly  
210 215 220

Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His  
225 230 235 240

Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys  
245 250 255

Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile  
260 265 270

Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro

275	280	285
-----	-----	-----

Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys

290	295	300
-----	-----	-----

Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp

325	330	335
-----	-----	-----

Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp

340	345	350
-----	-----	-----

Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro

355	360	365
-----	-----	-----

Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser

370	375	380
-----	-----	-----

Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Cys Leu Trp Val Tyr Ile

405
-----

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

本発明の実施例におけるH B s A g 遺伝子の各タンパク質領域を表す概略模式

図である。

【図2】

本発明の実施例における遺伝子組換え酵母を用いたHBsAg粒子の発現及び精製操作を例示した概略説明図である。

【図3】

本発明の実施例におけるhFVIII遺伝子を包含したHBsAg粒子による血液凝固第VIII因子の発現効果を示す図である。

【図4】

本発明の実施例におけるhFIX遺伝子を包含したHBsAg粒子による血液凝固第IX因子の発現効果を示す図である。

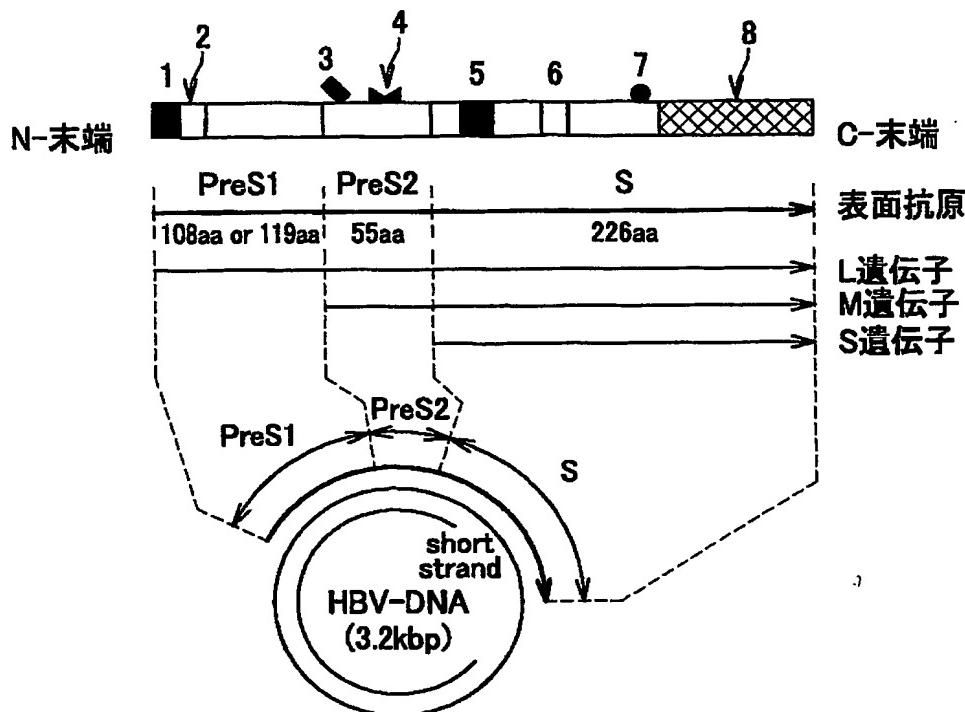
【符号の説明】

- 1 粒子形成抑制部位、2 直接的なヒト肝細胞特異的レセプター、3 糖鎖
- 1、4 間接的なヒト肝細胞特異的レセプター（重合ヒト血清アルブミンレセプター）、5 膜貫通領域1、6 膜貫通領域2、7 糖鎖2、8 膜貫通領域3

【書類名】

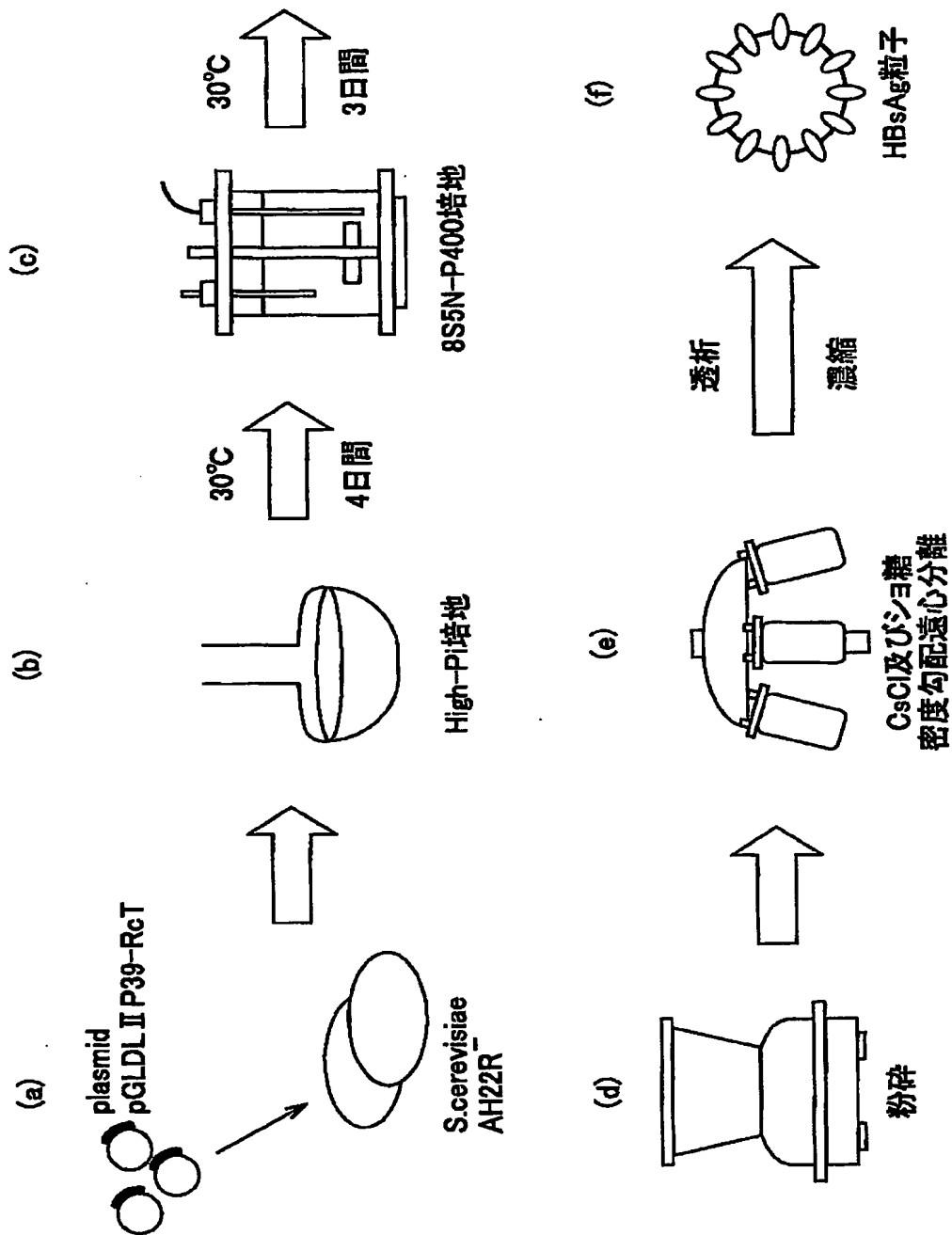
図面

【図 1】

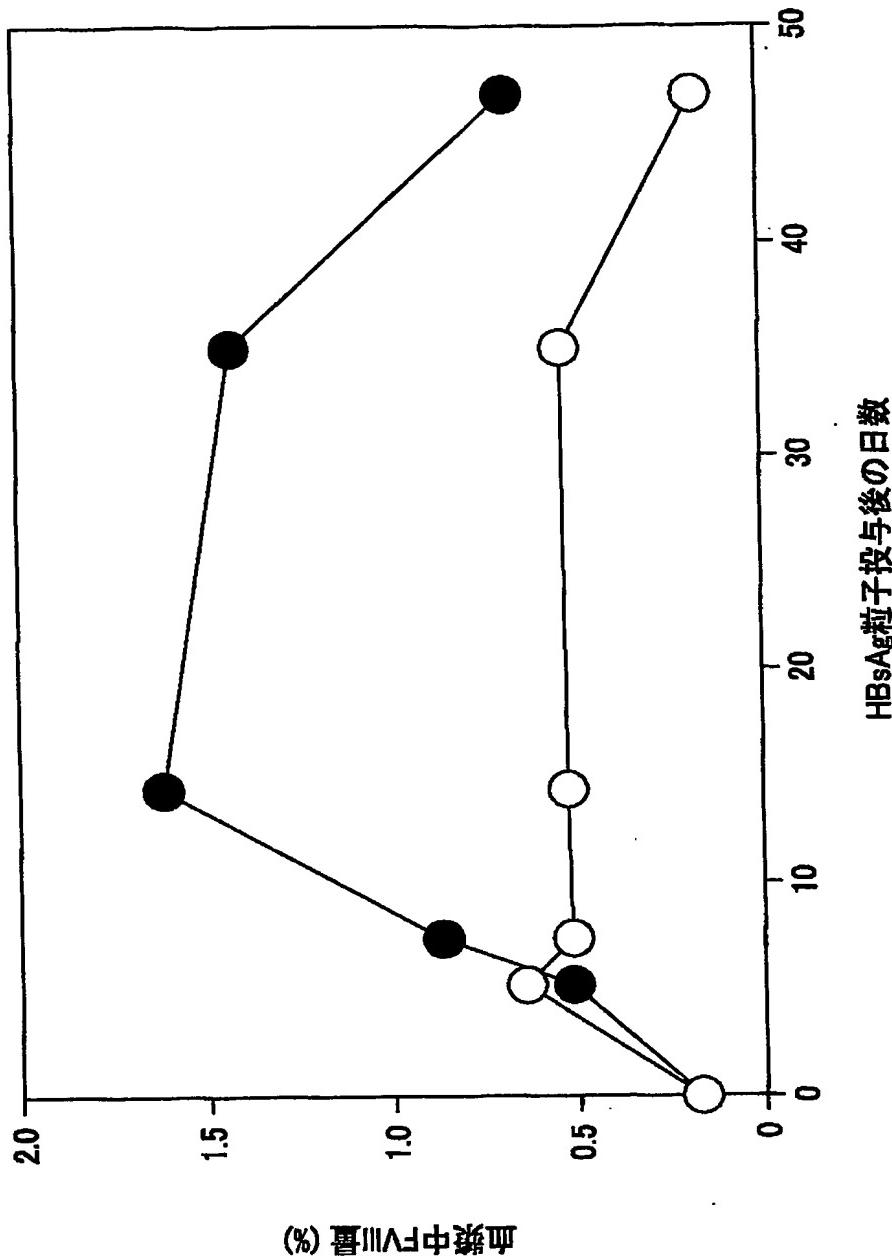


- 1 粒子形成抑制部位
- 2 直接的なヒト肝細胞特異的レセプター
- 3 糖鎖1
- 4 間接的なヒト肝細胞特異的レセプター  
(重合ヒト血清アルブミンレセプター)
- 5 膜貫通領域1
- 6 膜貫通領域2
- 7 糖鎖2
- 8 膜貫通領域3

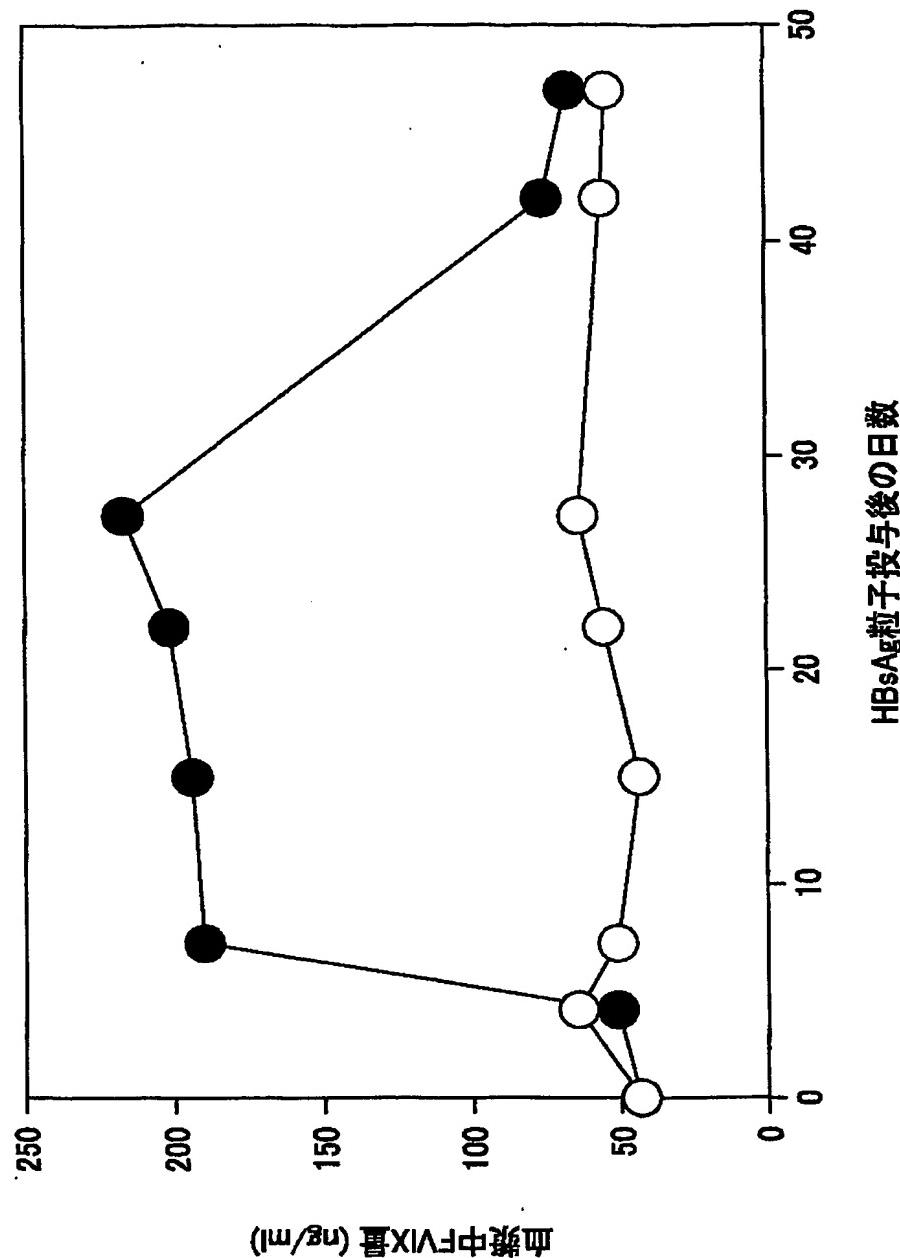
【図2】



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 簡便な方法により血液凝固因子の遺伝子を肝細胞に効率的に導入することができると共に副作用の心配も極めて低い薬剤、及びその薬剤を用いた治療方法を提供する。

【解決手段】 粒子形成能を有するタンパク質、例えばB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質を真核細胞中で発現させることにより得られた中空ナノ粒子に、血友病治療用の血液凝固第VIII（IX）因子の遺伝子を包含させる。

【選択図】 なし

特願 2003-071788

出願人履歴情報

識別番号

[503100821]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

2003年 3月17日

新規登録

岡山県岡山市門田文化町2-10-13

有限会社ピークル

特願 2003-071788

## 出願人履歴情報

識別番号 [503102467]

1. 変更年月日 2003年 3月17日

[変更理由] 新規登録

住 所 ベルギー王国、B-9052 ズビナーデ リビッシェストラ  
ート 120氏 名 ブイアイビー (ヴァーラム インターユニベルシテール イ  
ンスティチュート フォア ビオテクノロジー) ブイジーダ  
ブリュ

特願 2003-071788

出願人履歴情報

識別番号

[503102560]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

2003年 3月17日

新規登録

ベルギー王国、B-3000 リューベン ヘーレストラート  
49

デー. コーレン リサーチ ファオンドシオン ブイジーダブ  
リュ オンデルビース アン ナボルシング カンパス ガス  
チュイスペルグ ケ. ユー. リューベン